

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

**Seroepidemiologische Untersuchungen über das
Vorkommen der Epizootischen Virusdiarrhoe (EVD)
der Schweine in der Schweiz und Versuch der
Virusvermehrung in Zellkulturen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Martin Hofmann
Tierarzt
von
Sissach BL

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. H. Keller, Korreferent

Zürich 1987

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

**Seroepidemiologische Untersuchungen über das
Vorkommen der Epizootischen Virusdiarrhoe (EVD)
der Schweine in der Schweiz und Versuch der
Virusvermehrung in Zellkulturen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Martin Hofmann
Tierarzt
von
Sissach BL

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. H. Keller, Korreferent

Zürich 1987

Rieker + Partner AG, Glattbrugg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Viren als Durchfallerreger beim Schwein	1
1.2. Die Epizootische Virusdiarrhoe	2
1.2.1. Allgemeines	2
1.2.2. Charakterisierung des Virus der Epizootischen Virusdiarrhoe	2
1.2.3. Klinik	2
1.2.4. Pathogenese	3
1.2.5. Labordiagnose	4
1.3. Fragestellung	4
2. MATERIAL UND METHODEN	5
2.1. Material	5
2.1.1. Virus	5
2.1.2. Versuchstiere	5
2.1.3. Zellkulturen	5
2.1.4. Seren	6
2.2. Methoden	6
2.2.1. Virusvermehrung im Tierversuch	7
2.2.2. Herstellung eines anti-EVDV-Hyperimmunserums	7
2.2.3. Virusantigennachweis	8
2.2.3.1. Direkte Immunfluoreszenz (DIF)	8
2.2.3.2. Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	9
2.2.3.3. Coronavirusnachweis im Elektronenmikroskop	10
2.2.4. Antikörperrnachweis	10
2.2.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz	10
2.2.5. Virusvermehrungsversuche in Zellkulturen	11

3. RESULTATE	15
3.1. Tierversuche	15
3.1.1. Virusantigengewinnung mit Saugferkeln	15
3.1.2. Immunisierung von Jagerschweinen und Antiserumgewinnung	15
3.2. Virusantigennachweis und -identifizierung	16
3.3. Antikörpernachweis und seroepidemiologische Untersuchungen	20
3.4. Virusvermehrung in Zellkulturen	24
4. DISKUSSION	26
4.1. Tierversuche	26
4.2. Serologie	27
4.3. Die EVD in der Schweiz	28
4.4. Zellkulturversuche	30
5. ZUSAMMENFASSUNG	31
6. LITERATURVERZEICHNIS	32
7. VERDANKUNGEN	38
8. LEBENS LAUF	39

1. EINLEITUNG

1.1. Viren als Durchfallerreger beim Schwein

Im Kot und im Darm von Schweinen können elektronenoptisch Viren aus ganz verschiedenen taxonomischen Familien nachgewiesen werden, so zum Beispiel Adeno-, Picorna-, Parvo-, Rota- oder Coronaviren. Von diesen sind allerdings nur drei regelmässig mit Durchfall vergesellschaftet und daher als enteropathogen zu bezeichnen. Es sind dies die zu den Coronaviren zählenden Erreger der Transmissiblen Gastroenteritis (TGE), der Epizootischen Virusdiarrhoe (EVD) und Rotaviren (26, 35, 36). Die ätiologische Bedeutung der übrigen genannten Viren ist noch nicht abgeklärt (35).

Die erwähnten Coronaviren und die Rotaviren kommen weltweit vor. Obwohl sie sich aufgrund des Krankheitsgeschehens unterscheiden, beruht die Infektion auf ähnlichen pathogenen Mechanismen. Nach oraler Aufnahme vermehrt sich das Virus in den Zottenepithelzellen vor allem des Dünndarmes, wobei die Coronaviren den ganzen Zottenbereich (mit Ausnahme der Krypten) befallen, die Rotaviren sich jedoch nur in den differenzierten Enterozyten der Zottenspitze replizieren. Die Zerstörung dieser Zellen führt zu einer reduzierten Absorption der Nährstoffe aus dem Darmlumen. Da die Sekretion von Flüssigkeit in das Darmlumen normal weiterläuft und die nicht absorbierten Metaboliten zusätzlich osmotisch wirksam sind, führt dieses Ungleichgewicht von Sekretion und Absorption zu Durchfall mit nachfolgender Dehydratation und Azidose und, je nach Schweregrad der Diarrhoe, schliesslich zum Tod (16).

1.2. Die Epizootische Virusdiarrhoe (EVD)

1.2.1. Allgemeines

Die Krankheit wurde erstmals 1977 erwähnt (44). Ursprünglich als Epidemic Diarrhoea Typ II bezeichnet (4, 45), wurde sie in der Folge von mehreren Autoren als eigenständige, nicht mit anderen Coronavirusinfektionen verwandte Krankheit beschrieben (6, 22, 24, 40) und Epizootische Virusdiarrhoe, respektive im englischen Sprachraum Porcine Epidemic Diarrhoea (PED) genannt (17, 23, 43).

1.2.2. Charakterisierung des EVD-Virus (EVDV)

Das EVDV wird aufgrund seiner morphologischen Merkmale, basierend auf elektronenoptischen Aufnahmen, zu der Familie der Coronaviridae gezählt (23, 24, 43). Es handelt sich um pleomorphe Partikel mit einem Durchmesser zwischen 80 und 190 nm. Aus der Hülle ragen kranzartig circa 20 nm lange, blütenblattförmige Spikes hervor (3, 13, 34, 41). Das Virus vermehrt sich im Zytoplasma der Darmepithelzellen durch Sprossung an den Lamellen des endoplasmatischen Retikulums. Die vollständigen Viruspartikel werden durch Exozytose oder durch Ruptur der Zellmembran aus der Zelle freigesetzt (9). Bis heute konnte keinerlei antigene Verwandtschaft mit irgendeinem anderen Coronavirus festgestellt werden (25). Ebenso wenig ist es bis heute gelungen, das EVDV ausserhalb seines natürlichen Wirtes zur Vermehrung zu bringen (Zell-, Organkulturen). Die Tenazität an der Aussenwelt ist gering.

1.2.3. Klinik

Beim Saugferkel setzt nach einer Inkubationszeit von 21 bis 42 Stunden plötzlich starker wässriger Durchfall und Erbrechen ein (7, 43), wobei die Sauglust

zunächst erhalten bleibt. Bereits wenige Stunden später weisen die Tiere Anzeichen von Dehydratation auf. Ferkel, die jünger als eine Woche sind, sterben im allgemeinen nach einer Krankheitsdauer von 3 - 5 Tagen. Die Mortalität beträgt in der Regel 100%. Bei grösseren Schweinen ist die Inkubationszeit auf mehr als 2 Tage verlängert und die Tiere erholen sich nach einer Krankheitsdauer von 4 - 6 Tagen wieder. Als Hauptsymptome beobachtet man ebenfalls Erbrechen, Durchfall, aber auch eine starke Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, eventuell mit Festliegen und Anorexie. Krankheitsbedingt verlieren die Tiere massiv an Gewicht und bleiben auch nachher im Wachstum zurück. Obwohl die Infektion in einem Schweinebestand etwas weniger foudroyant verläuft als bei der Transmissiblen Gastroenteritis, lassen sich die beiden Krankheiten klinisch nicht voneinander unterscheiden.

1.2.4. Pathogenese

Die Infektion mit dem EVD-Virus (EVDV) erfolgt fast ausschliesslich durch die orale Aufnahme virushaltigen Kotes. Anschliessend vermehrt sich das Virus in den Epithelzellen der Dünndarmzotten, und zwar im ganzen Zottenbereich (5). In den Krypten hingegen sind nur einzelne Zellen befallen (28). Im Unterschied zum TGE-Virus repliziert sich das EVDV auch in beschränktem Ausmass im Kolonepithel (8, 10). Durch die Infektion kommt es zur Degeneration der Zellen. Diese lösen sich ab, was zu einer starken Zottenverkürzung von normalerweise circa 700 µm auf 200 - 300 µm führt. Dadurch wird zusätzlich zur Funktionsstörung der noch vorhandenen Epithelzellen die resorbierende Oberfläche im Darm reduziert, was zum oben beschriebenen Durchfall führt. Ultrastrukturell lassen sich an den infizierten Zellen verschiedene Veränderungen feststellen. Das Zytoplasma ist vakuolisiert. Oft lassen sich mit Viruspartikeln angefüllte, dilatierte Zysternen des rauen endoplasmatischen Retikulums beobachten. Später verliert die Zelle den Bürstensaum und degeneriert schliesslich vollständig (11, 18).

1.2.5. Labordiagnose

Wie schon erwähnt, kann anhand der klinischen Symptome nur eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Schlüssig sind einzig der Nachweis des Virus oder der Antikörper, die frühestens 10 Tage post infectionem (p.inf.) auftreten (30). Dazu wird das Virusantigen entweder mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz in Dünndarmgefrierschnitten erkrankter Schweine oder mittels ELISA im Kot nachgewiesen (2, 7, 23, 43). Das Virus ist aber auch elektronenoptisch nachweisbar, wobei jedoch immunelektronenmikroskopisch (25) oder serologisch eine TGE-Infektion ausgeschlossen werden muss. EVD-Antikörper werden mittels der indirekten Immunfluoreszenz (29) oder des ELISA-Blocking-Tests (2) nachgewiesen.

1.3. Fragestellung

Das EVDV ist in Europa weit verbreitet und konnte auch in Kanada nachgewiesen werden (40). In der Schweiz wurden bisher noch keine systematischen Untersuchungen über das Vorkommen der EVD durchgeführt. Einzig in einer Blutprobe unbekannter Herkunft fand Prof. Pensaert, Gent, Antikörper gegen das EVDV. Vermutungen, dass diese Krankheit in der Schweiz ebenfalls heimisch ist, ergeben sich aus der Beobachtung, dass bei Ausbrüchen des sogenannten "Luzerner Schyssers" - eine vor allem in der Zentralschweiz schon seit langem bekannte, seuchenhafte Durchfallerkrankung - bislang weder TGE-Virus noch ein anderes Agens nachgewiesen werden konnte.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Einführung der serologischen Diagnose der EVD und eine Abklärung bezüglich der Verbreitung der Infektion in der schweizerischen Schweinepopulation. Ein zweiter Schwerpunkt lag auf dem Versuch, das EVDV in vitro zur Vermehrung zu bringen, um so die Virusantigengewinnung im Saugferkel zu umgehen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Virus

Von Prof. K.H. Witte, Arnsberg (BRD) wurden 5 ml einer aus SPF-Ferkeln (spezifisch pathogenfreie Ferkel) gewonnenen EVD-Viruspräparation zur Verfügung gestellt. Dieses Material wurde bei -70°C gelagert und diente zur Infektion neugeborener Ferkel, um genügend Virusmaterial für die weitere Arbeit gewinnen zu können.

2.1.2. Versuchstiere

Die Infektionsversuche wurden mit 2 neugeborenen, 1 Tag alten Minipig-Ferkeln (Institut für Zuchthygiene der Universität Zürich) und mit 3 neugeborenen SPF-Ferkeln der VLS-Rasse (veredeltes Landschwein), die kein Kolostrum erhalten hatten, durchgeführt. Für die Gewinnung eines anti-EVDV-Hyperimmunserums wurden 2 Wochen alte Jäger derselben Rasse verwendet. Alle VLS-Schweine stammten aus einem SPF-Betrieb im Kanton Thurgau.

2.1.3. Zellkulturen

Die in vitro-Virusvermehrungsversuche führte man mit zwei Gruppen von Zellkulturen durch. Einerseits wurden aus Schweineföten verschiedene Primär- und Sekundärzellkulturen hergestellt, und zwar von Darm, Niere, Hoden, Lunge, Thymus, Pankreas, Schilddrüse, Nasenmuschel, Milz und Herzmuskel. Andererseits wurden folgende am Institut für Virologie vorhandenen Zelllinien getestet: Porcine Kidney (PK15), Porcine Thyreoidea (PD5), Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), Human Rectal Tumor (HRT), Vero und HeLa. Im weiteren erhielten wir

von Dr. E. Sterchi (Inselspital Bern) die humane Dickdarmkarzinomzelllinie CaCo-2 (27).

2.1.4. Seren

Als Referenzseren stellten uns Prof. M. Pensaert, Gent, und Prof. K.H. Witte, Arnsberg, je ein Aliquot anti-EVDV-Hyperimmunserum (IIF-Titer 1:12800) und anti-EVDV-Fluoreszein-Isothiocyanat-(FITC-) Konjugat für die direkte Immunfluoreszenz zur Verfügung.

Die 2853 getesteten Probeseren wurden im Rahmen einer Dissertation (1) zur Abklärung der Verbreitung der TGE in der Schweiz von M. Bereiter, SGD-Genossenschaft Zürich, gesammelt. 1859 dieser Seren stammten aus mehreren Schlachthöfen, zur Hauptsache jedoch aus dem Schlachthof der Firma Hero in Lenzburg. Das Einzugsgebiet dieser Schlachthöfe umfasste die ganze Schweiz, doch liess sich die Herkunft der einzelnen Tiere, von denen anlässlich der Schlachtung Blut entnommen wurde, grösstenteils nicht eruieren. Die restlichen 994 Seren wurden in 25 Schweinezucht- und -mastbetrieben entnommen, in denen akute Durchfälle aufgetreten waren oder die mit Tieren aus TGE-serologisch positiven Betrieben Kontakt gehabt hatten. Diese Schweine stammten vor allem aus den Kantonen LU, AG, TG, BE und SG sowie vereinzelt aus 10 weiteren Kantonen. Die Seren wurden anfänglich versehentlich längere Zeit bei 4°C aufbewahrt, vor Beginn der eigenen Untersuchungen jedoch bei -20°C eingefroren.

2.2. Methoden

2.2.1. Virusvermehrung im Tierversuch

Die Saugferkel wurden nach ihrer Ankunft am Institut bei 35°C in sterilen

Inkubatoren (AG für SPF-Tiere, Sursee) gehalten, wie sie für die Aufzucht von Hysterotomieferkeln (19) verwendet werden. Die Fütterung erfolgte 5 mal täglich mit sterilisierter Ferkelmilch. Weil ein SPF-Ferkel infolge einer Verschluckpneumonie vorzeitig euthanasiert werden musste, wurde den Tieren in den folgenden Versuchen täglich 0,07 ml eines Trimetoprim-Sulfonamid-Präparates (Maxutrim®, Veterinaria, Zürich) intramuskulär (i.m.) injiziert. 2 bis 4 Stunden nach der Ankunft wurden die Tiere mit einer 1:10 in steriler PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) verdünnten Virussuspension (Witte) wie folgt infiziert: 2 ml oral, 0.2 ml intranasal und je 0.1 ml konjunktival. Maximal 2 Stunden nach Einsetzen des Durchfalles respektive nach Ablauf der maximalen Beobachtungszeit von 5 Tagen wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von 1.0 ml eines Pentobarbiturates (Vetanarcol®, Veterinaria, Zürich) euthanasiert. Die Entnahme des ganzen Darmtraktes erfolgte gleich anschliessend. Für den Virusstock wurden circa 10 cm lange Darmsegmente in Hühnereiweiss (43) eingebettet. Für die Anfertigung der Gefrierschnitte wurden 0.5 cm lange Dünndarmsegmente verschiedener Lokalisation in ein hochvisköses Einbettungsmittel verbracht und eingefroren. Dieses bestand aus 4% Carboxy-Methylcellulose (CMC) (BDH Chemicals Ltd, Poole, GB) in PBS. Die Lagerung des Virusmaterials erfolgte bei -70°C.

Die Viruspräparationen für die Zellkulturversuche und die Immunisierung wurden nach Witte (43) hergestellt (virushaltige Därme verreiben, mit 4-fachem Volumen PBS verdünnen), wobei die Entkeimung anstatt mittels Stufenfiltration durch Zellulosenitratfilter durch zweimalige Zentrifugation (je 15 min bei 8000 g, 4°C) erfolgte. Dadurch sollten Verluste durch Virusadsorption an die Filtermembran verhindert werden.

2.2.2. Herstellung eines anti-EVDV-Hyperimmunserums

Für die Immunisierung wurden zwei männliche, 8 Wochen alte,

15 beziehungsweise 17 kg schwere SPF-Schweine benutzt. Die Tiere wurden im institutseigenen Isolationsstall gehalten und mit handelsüblichem Aufzucht-Alleinfutter gefüttert (Automatenfütterung). Stroh und Wasser stand ad libitum zur Verfügung. 6 Tage nach der Einstallung wurde das eine Tier zur Grundimmunisierung mit 10 ml der Viruspräparation (2.2.1.) per os und je 1 ml beidseitig intranasal infiziert. Das andere wurde als Kontakttier benutzt. Beiden Schweinen wurde zum gleichen Zeitpunkt je 5 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nachdem die Tiere erkrankten, wurde frisch abgesetzter Durchfallkot gesammelt, 1 : 5 mit steriler PBS verdünnt, keimfrei zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren. Zur Titerkontrolle erfolgten 14 Tage und 3 Wochen nach der Primärinfektion weitere Blutentnahmen. Gleichzeitig wurde i.m. geboostert mit 1 ml Viruspräparation (2.2.1.). Diese war zuvor mit 1 ml komplettem Freud'schem Adjuvans gemischt worden. Weitere Boosterungen mit steigenden Antigenmengen folgten im Abstand von 3 Wochen. 11 Wochen nach der Grundimmunisierung wurden beide Schweine oral mit je 60 ml Viruspräparation reinfiziert und einer 4.Boosterung (i.m., auf mehrere Stellen verteilt) unterzogen. Da die Antikörpertiter eine Woche später genügend hoch waren, wurden die Tiere geschlachtet (Lebendgewicht circa 75 kg). Sämtliches Blut wurde aufgefangen, anschliessend 4 Stunden bei Zimmertemperatur und - nach Lösung des Koagulum von der Gefässwand - über Nacht bei 4°C stehengelassen. Hierauf wurde das Blut bei 300 g während 20 min zentrifugiert, das Serum dekantiert, portioniert und bei -20°C eingefroren.

2.2.3. Virusantigennachweis

2.2.3.1. Direkte Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden im Kryostaten (Cryo-Cut, American Optical Corp., Buffalo, New York, USA) bei -22°C 6µm dicke Transversalschnitte von den in CMC

eingebetteten und tiefgefrorenen Darmsegmenten angefertigt und auf normale Objektträger aufgebracht. Diese waren zwecks besserer Haftung der Gefrierschnitte vorgängig mit einer Chromalaun-Gelatine-Lösung beschichtet worden. Nach Lufttrocknung bei Zimmertemperatur wurden die Schnitte fixiert (20 min bei -20°C in Azeton) und wieder getrocknet. Zum Nachweis des Virusantigens wurden die Schnitte mit 20 µl des von Prof. Witte erhaltenen anti-EVDV-FITC-Konjugates (Gebrauchsverdünnung 1 : 8 in PBS) überschichtet und während 60 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Präparate 3 mal je 5 min in PBS gewaschen, getrocknet und mit einem Gemisch aus 4 Teilen Glycerin und 1 Teil PBS unter einem Deckglas eingeschlossen. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte mit einem Leitz Ortholux II-Mikroskop mit Auflichtfluoreszenz. Zur weiteren Charakterisierung des Virus wurden virusantigen-positive Schnitte mit anti-EVDV-Hyperimmunserum (Pensaert, Verdünnung 1 : 10) vorinkubiert und auf die Reduktion der Fluoreszenz nach der zweiten Inkubation mit anti-EVDV-FITC-Konjugat hin beurteilt. Als Kontrollen wurden virusantigen-negative Darmschnitte eines erdrückten Ferkels verwendet, sowie von den Därmen aller artifiziell infizierten Ferkel Schnitte mit einem anti-TGEV-FITC-Konjugat (Pensaert) und einem anti-Schweine-Antikörper-FITC-Konjugat (Rabbit anti IgG Swine FITC, Nordic, Tilburg, Netherlands) allein inkubiert.

2.2.3.2. Indirekte Immunfluoreszenz

Zum Virusantigennachweis wurden die unter 2.2.3.1. beschriebenen fixierten Schnitte zuerst 2 Stunden mit anti-EVDV-Hyperimmunserum (Pensaert, Witte) in einer Verdünnung von 1 : 100 in PBS inkubiert, 3 mal je 5 min in PBS gewaschen, getrocknet und anschliessend während 30 min mit anti-Schweine-IgG-FITC-Konjugat (1 : 100 verdünnt) inkubiert (2. Bindung). Zur Kontrolle wurden wiederum virusantigen-freie Schnitte mitgeführt sowie die EVDV-positiven Schnitte zuerst mit anti-TGEV-Serum respektive einem negativen Kontrollserum eines

Hysterotomieferkels sowie mit PBS allein vorinkubiert.

2.2.3.3. Coronavirsnachweis im Elektronenmikroskop

Die aus den infizierten Ferkeln hergestellten Viruspräparationen und die Durchfallkotproben wurden elektronenoptisch auf Coronaviren untersucht. Dazu wurden die Kotproben zuerst 1 : 5 mit PBS verdünnt, danach 10 sec mit Ultraschall (Sonifier B 30, Branson Sonic Power Corp.) behandelt zur Lösung der Aggregate und anschliessend 10 min bei 13000 rpm (Biofuge A, Heraeus, Zürich) klarzentrifugiert. Formvar-beschichtete Grids (Trägernetze) mit 200 Maschen wurden mit 50 µl des Überstandes respektive der Viruspräparationen während 5 min überschichtet, danach 5 min mit 2% Phosphorwolframsäure (PTA), pH 6.7, während 5 min kontrastiert. Die Untersuchung erfolgte mit einem Philips PW 6006-Elektronenmikroskop bei 30'000-facher Vergrösserung. Neben der direkten Elektronenmikroskopie wurde auch versucht, die Viruspartikel mittels Immuielektronenmikroskopie (12) auf den Grids anzureichern.

2.2.4. Antikörperrnachweis

2.2.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Die Herstellung der virusantigenhaltigen Dünndarm-Gefrierschnitte erfolgte nach der unter 2.3.3.1. beschriebenen Methode. Die je 4 Schnitte pro Objektträger wurden nun aber statt in Azeton in Aethanol während 15 min bei 4°C fixiert. Damit sich die Seren während der Inkubation nicht durchmischten, wurden die einzelnen Schnitte mit dünnflüssigem Korrekturlack (Tipp-Ex® fluid, Tipp-Ex Vertrieb GmbH, Frankfurt, BRD) umrandet. Danach wurden die 1 : 100 in Fluoreszenzantikörpertest-puffer (FAT-Puffer: 0.15 M NaCl, 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.8) verdünnten und wegen der bakteriellen Kontamination klarzentrifugierten (5 min bei 13'000 rpm)

Probeseren aufgetragen. Die Präparate wurden 2 Stunden bei 37°C im Dunkeln inkubiert, dann 3 mal je 5 min in FAT-Puffer gewaschen, kurz in H₂O bidest. gespült und föngetrocknet (handwarm). Anschliessend wurde während 30 min mit dem ebenfalls 1 : 100 in FAT-Puffer verdünnten anti-Schweine-IgG-FITC-Konjugat inkubiert. Hierauf wurde 3 mal in FAT-Puffer gewaschen, gespült in H₂O bidest. und getrocknet. Zuletzt erfolgte das Einschliessen der Präparate mit einem Gemisch aus 1 Teil Glyzerin und 1 Teil FAT-Puffer. Die Schnitte wurden innert 2 Stunden nach der Anfertigung im Auflichtfluoreszenzmikroskop beurteilt.

Für die Bestimmung der Titer wurden die Seren nach der obigen Methode 1 : 100 vorverdünnt und danach Verdünnungsreihen mit einem Faktor 2 bis zu einer Endverdünnung von 1 : 12'800 erstellt. Mit jeder Serumverdünnung wurde ein Darmschnitt überschichtet. Als Titer wurde diejenige Verdünnung gewählt, bei welcher die spezifische Zottenepithelfluoreszenz gerade noch erkennbar war.

2.5. Virusvermehrungsversuche in Zellkulturen

Für die verschiedenen Zellkulturen wurden folgende Nährmedien benutzt: E'MEM (Eagles Minimum Essential Medium, Amimed, Basel) für alle aus Schweineföten gewonnenen Zellkulturen, sowie MDBK und Vero; E'MEM mit Zusätzen von Tryptosephosphat, nicht-essentiellen Aminosäuren und Natriumpyruvat für PD5 und PK15; D'MEM (Dulbecco Modified Eagles Medium, Gibco BRL, Basel) mit Zusätzen von nicht-essentiellen Aminosäuren für HeLa und CaCo-2; schliesslich RPMI 1640 (Gibco BRL, Basel) für die HRT-Zellen. Sämtliche Anzuchtmedien waren mit HEPES (30 mM) gepuffert und wurden supplementiert mit 10% FCS (Fetal Calf Serum, Nabi, Florida, USA), sowie mit Antibiotika (100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µg/ml Neomycin und 100 I.E./ml Polymyxin B) und Econazol® (1 µg/ml) zur Verhinderung von Schimmelpilzkontaminationen. Mit Ausnahme der CaCo-2-Zellen wurden alle Zellen folgendermassen passagiert: Nach Absaugen

des Mediums wurde einmal mit PBS gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen mit ATV (0.125% Trypsin + 0.025% Versen in PBS) während 10 min behandelt und je nach Zellart 1 : 2 bis 1 : 5 verdünnt und zusammen mit frischem Wachstumsmedium in neue Zellkulturflaschen (Corning Glassworks, Corning, New York, USA) gegeben. Die CaCo-2-Zellen wurden mit der EDTA-Methode passagiert (32). Alle Kulturen wurden in Flaschen von 75 cm² weitergezogen. Für die Infektionsversuche wurden Flaschen mit 25 cm² Wachstumsfläche desselben Herstellers verwendet.

In einer ersten Versuchsreihe wurden alle Zellen folgendermassen mit dem EVDV inokuliert: Das Wachstumsmedium wurde entfernt und einmal mit Erhaltungsmedium (2% FCS enthaltend) gewaschen. Anschliessend wurde 0.1 ml der Virussuspension und 0.4 ml Erhaltungsmedium zugegeben und während 1 Stunde bei Raumtemperatur adsorbiert. Danach wurden 5 ml Erhaltungsmedium zugegeben und die Kulturen 10 Tage bei 37°C inkubiert. Kulturen ohne zytopathischen Effekt (ZPE) wurden zweimal blind passagiert. Dazu wurden die Zellen einmal eingefroren und aufgetaut und anschliessend mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zentrifugation der Zelltrümmer wurden 0.5 ml des Überstandes auf neue Zellkulturen gegeben und gleichzeitig bei jedem Versuch auf Deckgläsern gewachsene Zellen inokuliert. Diese fixierten wir zu verschiedenen Zeitpunkten mit Aethanol während 15 min bei 4°C und verwendeten sie für den EVDV-Nachweis mittels direkter Immunfluoreszenz (2.2.3.1.) . Bei späteren Versuchen wurden ergänzend zu obigen Methoden ein Teil der infizierten Zellen vor dem Gefrieren mechanisch aus den Kulturflaschen entfernt, mit ATV Einzelzellen gewonnen und diese auf einem Objektträger angetrocknet. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei den Deckglaskulturen.

Weil FCS bei gewissen Coronaviren die Adsorption oder die Vermehrung verhindern kann (14, 15), wurden in einer zweiten Versuchsreihe alle Zellkulturen

zweimal mit FCS-freiem Medium gewaschen. Danach adsorbierte man das ebenfalls in FCS-freiem Erhaltungsmedium verdünnte Inokulum während 1 Stunde. Anschliessend wurde wiederum ohne Waschung FCS-freies Erhaltungsmedium zugegeben. Der Zusatz von Tryptosephosphat und Laktalbumin-Hydrolysat verhinderte eine vorzeitige Zelldegeneration.

Es ist bekannt, dass zur Vermehrung verschiedener Coronaviren sowie von Rota- und Astroviren (21, 42) in Zellkulturen Trypsin notwendig ist. Durch Beigabe von Trypsin ins Erhaltungsmedium oder durch vorherige Aktivierung des Inokulums mit Trypsin wird auch die Vermehrung von Coronaviren in Zellkulturen gefördert (46) oder überhaupt erst möglich (39). Neuere Untersuchungen (37, 38) haben gezeigt, dass dabei die proteolytische Spaltung eines Spike-Glykoproteins für die Adsorption an die Rezeptoren der Zelle sowie für die Fusion eine Rolle spielt. Daher wurden die Infektionsversuche mit allen Zellen in dreifachem Ansatz wiederholt, und zwar mit FCS-freien Medien, um die Neutralisation des Trypsins zu verhindern. Zum einen wurde nach der Adsorption Trypsin in Form von ATV (siehe oben) in einer Konzentration von 2 - 5 µg/ml zum Erhaltungsmedium gegeben. Die höchstverträglichen Trypsinkonzentrationen, bei denen sich die Zellen noch nicht von der Unterlage lösten, waren für alle Zellkulturen in Vorversuchen bestimmt worden. Zum andern wurde das in Erhaltungsmedium verdünnte Inokulum durch Beigabe von Trypsin (100 µg/ml) und 30-minütiger Inkubation bei 37°C aktiviert. Nach der Adsorption erfolgte die Zugabe von Erhaltungsmedium mit 1% FCS. Als dritte Variante wurden die beiden Verfahren kombiniert.

Zwecks Differenzierung der Zellen und eventueller Expression neuer Membran-(Rezeptor-) proteine wurde zu PD5- und CaCo-2-Zellkulturen 24 Stunden vor der Infektion Hydrocortison (10^{-6} M) sowie Insulin (1 I.E./ml) oder Dimethylsulfoxid (1%) zugegeben (33).

Weiter wurde versucht, das EVDV durch Ansäuerung des Inokulums auf pH 2.5 und Zugabe von 100 µg/ml Pepsin mit anschließender Inkubation bei 37°C während 30 min zu aktivieren.

3. RESULTATE

3.1. Tierversuche

3.1.1. Virusantigengewinnung in Saugferkeln

Die in einer ersten Versuchsreihe infizierten 2 Minipigs zeigten während der ganzen Beobachtungsperiode keinerlei Anzeichen einer Erkrankung, insbesondere wies der Kot nie eine abnormale Konsistenz auf. Daher wurden die Tiere 5 Tage p.inf. euthanasiert. Die im zweiten Versuch eingesetzten SPF-Ferkel erkrankten beide 24 respektive 30 Stunden p.inf. Die Kotkonsistenz wechselte schlagartig von normal zu wässrig. Dagegen war das Allgemeinbefinden und die Sauglust nicht reduziert. Da die Ferkel innert 2 Stunden nach Beginn des Durchfalls euthanasiert wurden, um einerseits eine grosse Virusernte zu gewährleisten und andererseits im Hinblick auf die Immunfluoreszenzversuche eine allzu stark fortgeschrittene Zottenschädigung im Dünndarm möglichst zu vermeiden, liess sich der weitere klinische Verlauf der Krankheit nicht verfolgen.

3.1.2. Immunisierung von Jagerschweinen und Antiserumgewinnung

Das artifiziell oral infizierte Jagerschwein erkrankte 48 Stunden p.inf. an zuerst dickbreiigem, später wässrigem Durchfall. Das nicht infizierte Kontakttier litt bereits 24 Stunden später ebenfalls an Durchfall. Beide Schweine zeigten ein gestörtes Allgemeinbefinden, stark reduzierten Futterverzehr, gesträubte Borsten und ein aufgezoogenes Abdomen. Im Verlauf der Krankheit wechselte die Kotkonsistenz bei beiden Schweinen mehrfach zwischen wässrig und dickbreiig. Vom 5. Krankheitstag an besserte sich der Allgemeinzustand, der Futterverzehr wurde wieder normal und der Kot nahm innerhalb von 2 Tagen allmählich eine physiologische Konsistenz an.

Bei den verschiedenen i.m. Injektionen zur Boosterung zeigten die Tiere keinerlei klinische Reaktion ausser einer Schwellung an der Injektionsstelle. Nach der oralen Reinfektion kam es erneut zu einer hochgradigen Depression der Tiere, hingegen war der Kot nur geringgradig verändert (dickbreiig). Beide Schweine genasen nach 3 Tagen.

Vor der Primärinfektion konnten im Serum keine Antikörper gegen das EVDV nachgewiesen werden. 14 Tage später traten bei beiden Tieren IgG auf, wobei der Titer beim primär artifiziell infizierten Schwein schneller anstieg, sich dann aber auf einem Plateau einpendelte. Beim Kontakttier lag der Titer anfänglich eher tief und stieg langsam an. Nach der Reinfektion der Tiere erreichten die Antikörpertiter relativ hohe Werte, die für die Verwendung als Hyperimmunserum ausreichten (Abb. 1). Deshalb wurden die Tiere geschlachtet. Die Serumausbeute betrug 1.2 l pro Tier (2.2.2.).

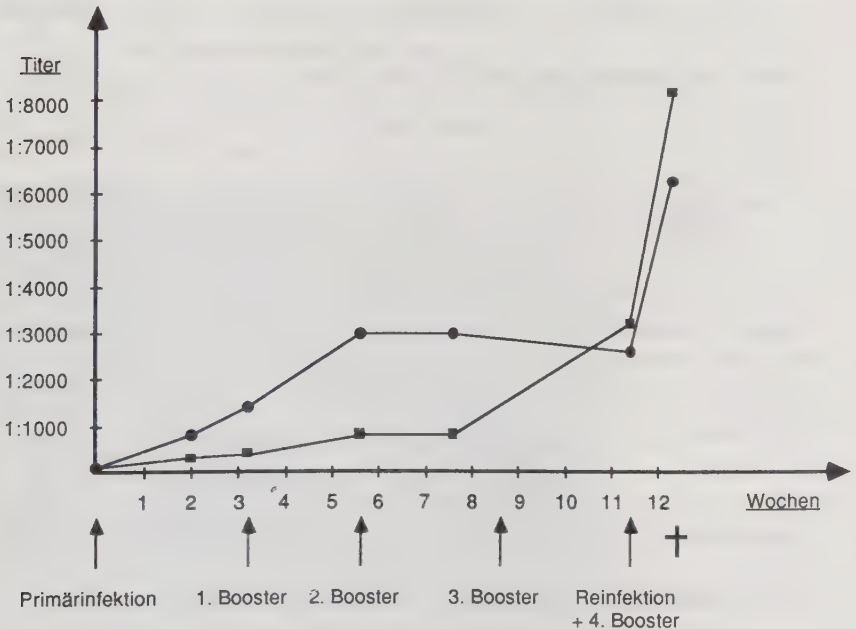
3.2. Virusantigennachweis und -identifizierung

Von jedem der infizierten Saugferkel wurden Kryostatschnitte von Duodenum, oberem, mittlerem und unterem Jejunum, Ileum und Kolon angefertigt. Bei den Tieren, die Durchfall zeigten, wiesen je nach Lokalisation zwischen 30 und 80% des Zottenepithels eine spezifische Fluoreszenz auf. Die Zottenstruktur war relativ gut erhalten, jedoch fehlte fast überall das Epithel der Zottenspitzen. Lumenseitig erschien die Zellstruktur zerstört, wogegen sich gegen die Zottenbasis eine sehr klare feingranuläre bis diffuse Zytoplasmafluoreszenz abzeichnete (Abb.3). Sämtliche untersuchten Dünndarmschnitte enthielten virusantigenhaltige Zellen, dagegen konnte im Kolon keine spezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Interessanterweise fand sich auch in den Darmepithelien der beiden infizierten Minipigs, die nie Durchfall zeigten, Virusantigen, jedoch beschränkte sich die

Fluoreszenz auf einzelne gleichmässig verteilte Epithelzellen, wobei maximal 10% der Enterozyten befallen waren. Soweit es sich an den Gefrierschnitten beurteilen liess, war die Struktur der Zotten vollständig erhalten.

Abbildung 1: Antikörpertiter-Anstieg bei den zur Produktion eines anti-EVDV-Hyperimmunserums eingesetzten Jagerschweine
(● = infiziertes Tier; ■ = Kontakttier; † = Schlachtung)



In unseren Versuchen ergaben DIF und IIF übereinstimmende Resultate, wobei die IIF deutlich brillantere Fluoreszenz zeigte, aber verbunden war mit einer viel stärkeren unspezifischen Gewebefluoreszenz.

Zur Identifizierung des Virusantigens wurden die unter 2.2.3. beschriebenen Seren respektive Konjugate eingesetzt. Bei der DIF ergaben nur die anti-EVDV-FITC-Konjugate positive Resultate, und die Fluoreszenz wurde vollständig aufgehoben nach Vorinkubation mit anti-EVDV-Serum (Tabelle 1). Bei der IIF zeigten die Enterozyten nur nach Inkubation mit anti-EVDV-Serum und Kopplung von anti-IgG-FITC-Konjugat deutliche Fluoreszenz (Tabelle 2). In Darmschnitten der Kontrollferkel liess sich weder in der DIF noch in der IIF eine spezifische Fluoreszenz nachweisen.

Tabelle 1: Identifizierung des EVD-Antigens mittels direkter Immunfluoreszenz

Konjugat	Schnitte mit Virusantigen	Schnitte ohne Virusantigen
anti-EVDV-FITC (Pensaert)	pos	neg
anti-EVDV-FITC (Witte)	pos	neg
anti-TGEV-FITC	neg	neg
anti-IgG(Schwein)-FITC	neg	neg

Tabelle 2: Identifizierung des EVD-Antigens mittels indirekter Immunfluoreszenz

Darmschnitt	1. Bindung	2. Bindung	spezif. Fluoreszenz
mit Virusantigen	anti-EVDV-Serum (Pensaert)	anti-IgG(Schwein)-FITC	pos
"	anti-EVDV-Serum (Witte)	anti-IgG(Schwein)-FITC	pos
"	anti-TGEV-Serum	anti-IgG(Schwein)-FITC	neg
"	anti-EVDV-Serum (Pensaert)	anti-EVDV-FITC	neg
"	negatives Kontrollserum	anti-IgG(Schwein)-FITC	neg
"	PBS	anti-IgG(Schwein)-FITC	neg
ohne Virusantigen	anti-EVDV-Serum (Pensaert)	anti-IgG(Schwein)-FITC	neg

neg: keine spezifische Fluoreszenz

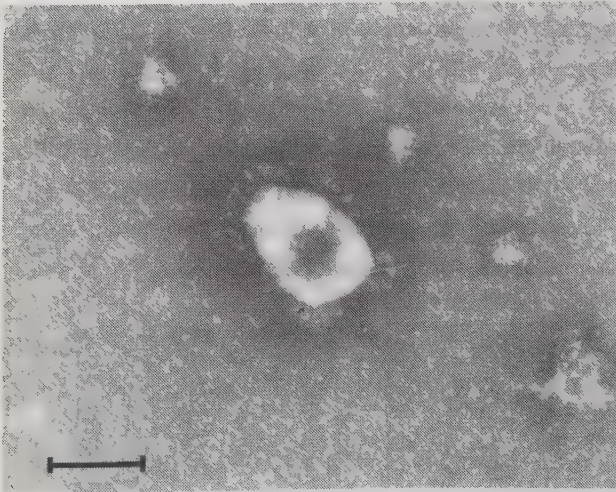
pos: EVDV-spezifische Fluoreszenz vorhanden

Elektronenmikroskopisch waren in allen untersuchten Viruspräparationen und auch im Durchfallkot der infizierten Ferkel Coronaviruspartikel zu finden (Abb. 2). Der direkte Virusnachweis diente gleichzeitig als Beweis dafür, dass der Durchfall bei

den Versuchstieren durch die Infektion mit dem EVDV und nicht etwa diätetisch bedingt war.

Die Immunelektronenmikroskopie hingegen erbrachte keine befriedigenden Ergebnisse, indem bei keinem Präparat eindeutig Coronaviren nachgewiesen werden konnten.

Abbildung 2: EVD-Viruspartikel aus Viruspräparation der infizierten SPF-Ferkel (Balken = 100 nm)



3.3. Antikörpernachweis und seroepidemiologische Untersuchungen

Die IIF-Titer der zuerst getesteten anti-EVDV-Hyperimmunseren (Pensaert, Witte) lagen bei einem Wert von 1 : 12'800, die der eigenen Seren bei 1 : 6400 (siehe 3.1.2.).

In einem ersten Durchgang wurden alle 2853 Feldseren in der niedrigstmöglichen Verdünnung von 1 : 100 auf die Präsenz von Antikörpern geprüft. Seren, die in dieser Verdünnung keine spezifische Fluoreszenz ergaben, wurden als negativ klassifiziert. Die Beurteilung der Zottenepithelfluoreszenz war erschwert durch eine intensive unspezifische Gewebefluoreszenz sowie durch die Anfärbung von Bakterien aus dem Darminhalt. Virusantigen fand sich jedoch nur im darmlumenseitigen Teil des Zottenepithels. Die spezifische Immunfluoreszenz war deutlich gegen die Zottenbasis hin abgegrenzt und fehlte im basalen Zottenbereich, was die Beurteilung erleichterte (Abb. 3).

Abbildung 3: Deutliche Zottenepithelfluoreszenz nach Inkubation eines Gefrierschnittes eines mit EVDV infizierten Ferkels mit anti-EVDV-Hyperimmunserum und anti-IgG(Schwein)-FITC-Konjugat
(links der virusantigenhaltige, apikale Zottenbereich, rechts die virusantigenfreie Zottenbasis)

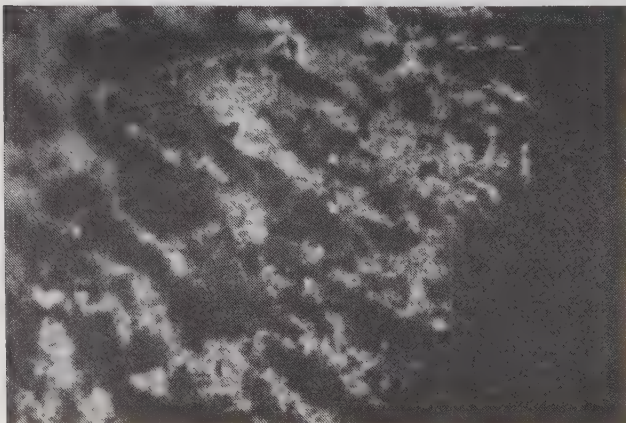


Abb. 4 vermittelt einen Überblick über die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen. Von den 1859 Seren, die von geschlachteten Mastschweinen und Muttersauen stammten, wiesen 29 Seren oder 1.6% Antikörper gegen das EVDV auf.

Die anderen 994 Seren stammten aus 25 verschiedenen Betrieben. 14 dieser Betriebe, die z.T. kontinuierlich Tiere neu eininstallen oder nach dem Rein-Raus-Verfahren bestossen wurden, hatten Probleme mit akuten Durchfällen. Die übrigen 11 Betriebe wurden als Nachbar- oder Folgebetriebe gezielt ausgewählt, nachdem in einem Mastbetrieb eine TGEV-Infektion festgestellt worden war (1). In diesen Betrieben waren keine Durchfälle aufgetreten und alle geprüften Seren aus diesen Betrieben waren EVD-negativ.

Innerhalb der 14 Betriebe mit Durchfallproblemen konnten in Seren von Tieren aus 7 Betrieben Antikörper gegen das EVDV nachgewiesen werden; in 2 weiteren Betrieben fanden sich Tiere mit Antikörpern gegen das TGEV (1) und bei den 5 übrigen waren bei den Schweinen weder anti-EVDV- noch anti-TGEV-Antikörper nachweisbar. In den 7 Betrieben, in denen anti-EVDV-positive Tiere gefunden wurden, wiesen 131 der total 271 untersuchten Seren Antikörper auf, wobei der Anteil positiver Seren pro Betrieb zwischen 17% und 100% lag (Tab. 3).

Die positiven Seren wurden in einem zweiten Arbeitsgang mit einem Verdünnungsfaktor 2 ausgetitert, wiederum beginnend mit einer Grundverdünnung von 1 : 100. Als Vergleich für die Titerwerte dienten die erwähnten Referenzseren (Pensaert, Witte, je 1 : 12'800; eigenes Serum, 1 : 6400). Die Titer der positiven Seren schwankten zwischen 1 : 100 und 1 : 3200. Der geometrische Mittelwert der Schlachthofseren betrug 1 : 160, wobei 87% der Seren Titerwerte zwischen 1 : 100 und 1 : 400 ergaben (Abb. 5). Der Mittelwert der Seren aus den Betrieben mit Durchfallproblemen lag bei 1 : 690, wobei 80% der Seren Titer von 1 : 400 und

Abbildung 4: Übersicht über die auf Antikörper gegen das Virus der EVD untersuchten Schweineseren

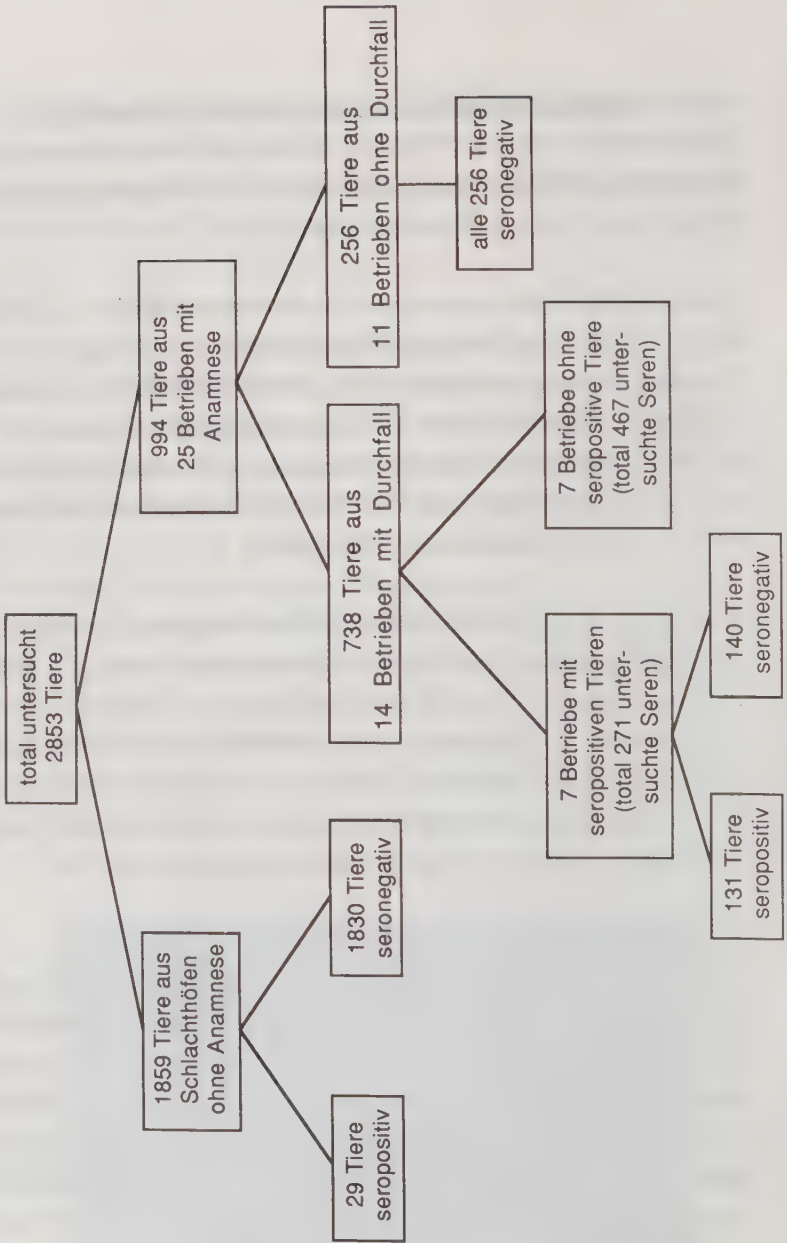
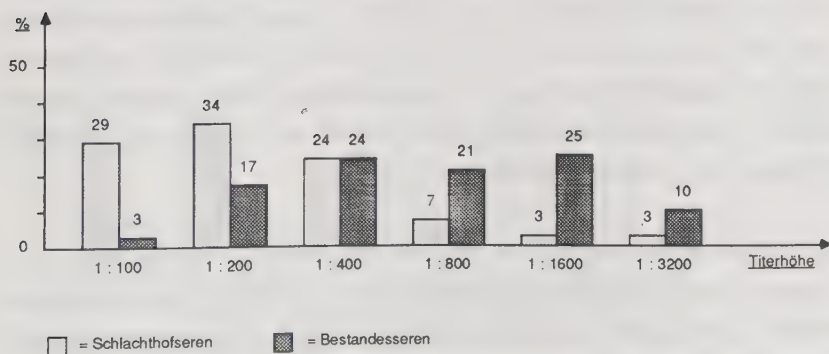


Tabelle 3: Serologisch ermittelte EVD-Durchseuchungsrate in Betrieben und geometrisches Mittel der Titerwerte

Betrieb Nr.	total untersuchte Tiere	seropositive Tiere	Durchseuchungsrate (%)	mittlere Titerhöhe (geom. Mittelwert)
1	48	8	17	1 : 566
2	46	37	80	1 : 929
3	57	31	54	1 : 895
4	22	15	68	1 : 1330
5	48	21	44	1 : 400
6	6	6	100	1 : 898
7	44	13	30	1 : 179
total	271	131	48	1 : 690
geschlachtete Tiere	1830	29	1.6	1 : 160

Abbildung 5: Prozentuale Häufigkeitsverteilung der ermittelten EVDV-Antikörpertiter (Zahlen über den Balken = Prozentwerte)



höher aufwiesen. Auch in den einzelnen Betrieben variierte das geometrische Mittel der Titer stark, und zwar von 1 : 179 bis 1 : 1330.

Bei den 7 Betrieben mit nachgewiesener EVD handelte es sich um 6 Mastbetriebe und 1 Zuchtbetrieb. Weder bei den Betriebsseren noch bei den Schlachthofseren konnte ein signifikanter Unterschied des geometrischen Mittels der Titer bei Mastschweinen und bei Muttersauen festgestellt werden.

3.4: Virusvermehrung in Zellkulturen

Eine eventuelle Virusvermehrung in Zellkulturen wurde spätestens 10 Tage nach Inokulation wie folgt getestet: 1) Mikroskopische Beurteilung eines ZPE, 2) Nachweis von intrazellulären Virusantigenen mittels direkter Immunfluoreszenz, 3) elektronenmikroskopische Untersuchung des Überstandes nach Aufschliessen der Zellen mittels Gefrieren/Auftauen und Ultraschallbehandlung.

Bei keiner der inokulierten Zellkulturen (2.1.3.) kam es mit FCS-haltigem Erhaltungsmedium zu einer nachweisbaren Virusvermehrung. Wenn FCS-freies Erhaltungsmedium verwendet wurde, musste die Inkubationsdauer bei sämtlichen sekundären Schweinezellkulturen auf 5 Tage reduziert werden, da es nach dieser Zeit auch bei den Zellkontrollen zu einer unspezifischen Zellablösung kam, die eine weitere Beurteilung verunmöglichte. Auch ohne FCS erwiesen sich alle getesteten Zellkulturen als nicht-permissiv für das EVDV.

Sowohl mit Trypsinaktivierung des Inokulums als auch durch Trypsinbeigabe zum Erhaltungsmedium konnte in keiner Zellkultur eine Virusvermehrung nachgewiesen werden. CaCo-2-Zellen lagerten sich unter Trypsin-Einwirkung dicht aneinander und dadurch entstand in der IIF und der DIF eine deutliche unspezifische Fluoreszenz. Die Empfindlichkeit gegenüber Trypsin zeigte grosse Unterschiede.

CaCo-2-Zellen erwiesen sich auch gegenüber hohen Trypsinkonzentrationen im Erhaltungsmedium (5 µg/ml) resistent, wogegen sich HeLa- und Vero-Zellen schon bei geringeren Konzentrationen (2 µg/ml) innert maximal 5 Tagen ablösten.

Sämtliche übrigen Versuche mit verschiedenen Zusätzen im Erhaltungsmedium (DMSO, Hydrocortison) sowie Vorbehandlungen des Inokulums (Ansäuerung, Pepsin-Behandlung) führten zu keiner nachweisbaren Vermehrung des EVDV in vitro (Tab. 4).

Tabelle 4: Zellkulturen und spezielle Bedingungen, unter denen die Vermehrung des EVDV versucht wurde

Zellen		1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)
primäre und sekundäre fötale Schweinezellkulturen	Darm	X	X	X	X	X	X	X		
	Niere	X	X	X	X	X				
	Hoden	X	X	X	X	X	X		X	X
	Lunge	X	X	X	X	X	X		X	X
	Thymus	X	X	X	X	X	X		X	X
	Pancreas	X	X	X	X	X	X	X		
	Schilddrüse	X	X	X	X	X				
	Nasenmuschel	X	X	X	X	X			X	X
	Milz	X	X	X	X	X				
	Herzmuskel	X	X	X	X	X			X	X
permanente Zelllinien	PD5	X	X	X	X	X			X	X
	PK 15	X	X	X	X	X				
	MDBK	X	X	X	X	X				
	HRT	X	X	X	X	X		X	X	X
	Vero	X	X	X	X	X			X	X
	HeLa	X	X	X	X	X				
	CaCo-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Bedingungen: 1) 2% FCS; 2) ohne FCS; 3) Trypsinaktivierung des Inokulums; 4) Trypsin im Erhaltungsmedium; 5) Kombination von 3) und 4); 6) Pepsinaktivierung des Inokulums; 7) Insulinzusatz; 8) Hydrocortisonzusatz; 9) DMSO-Zusatz

X = in vitro-Kulturversuche mit dem EVDV

4. DISKUSSION

4.1. Tierversuche

Die Infektionsversuche mit den kolostrumfreien SPF-Ferkeln zeigten, dass das EVDV für die Tiere hochinfektiös ist und dass sich das Virus ohne Schwierigkeiten in den Schweinen passagieren lässt; denn die Ferkel erkrankten nach einer kurzen Inkubationszeit, obwohl eine relativ niedrige Infektionsdosis verabreicht wurde. Interessanterweise erkrankten die beiden zuerst eingesetzten Minipigs, die ebenfalls kein Kolostrum erhalten hatten und mit derselben Virusdosis infiziert worden waren, nicht, obwohl, wie die Immunfluoreszenz zeigte, die Infektion im Dünndarm angegangen war. Allerdings waren nur etwa 5 - 10% der Zottenepithelzellen infiziert. Möglicherweise war dieser geringe Grad der Zellschädigung der Grund dafür, dass die Infektion bis zum Zeitpunkt der Euthanasie symptomlos verlief. Inwiefern Minipigs im Vergleich zu unseren einheimischen Schweinerassen für das EVDV weniger empfänglich sind, müsste jedoch mittels gezielter Untersuchungen abgeklärt werden.

Die Verwendung kolostrumfreier Tiere hatte zwei Hauptgründe: Einerseits konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das Kolostrum der Muttertiere der Ferkel Antikörper gegen das EVDV (vor allem IgA) enthielt und die Tiere somit nach Kolostrumaufnahme zumindest weniger empfänglich, wenn nicht gänzlich geschützt gewesen wären; andererseits wollte man verhindern, dass es in der IIF wegen der im Darm haftenden IgA (gegen irgendein Antigen gerichtet) zu unspezifischen Reaktionen kam.

Die durchgeführten Immunisierungsversuche bestätigten die Ergebnisse früherer Untersuchungen (30). Sowohl hinsichtlich des zeitlichen Auftretens der Antikörper im Serum als auch bezüglich der erreichten Titerhöhe deckten sich unsere

Ergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen. Es hat sich bestätigt, dass auch relativ hohe Antikörper-Titer im Serum die Tiere nicht vollständig gegen eine Reinfektion schützen (12); denn beide Tiere erkrankten erneut leichtgradig 11 Wochen nach der Primärinfektion anlässlich der oralen Reinfektion.

4.2. Serologie

In der Literatur sind mehrere Nachweismethoden für Antikörper gegen das EVDV beschrieben (2, 7, 29). Die IIF erwies sich in unserem Versuch als geeignetster Test, sowohl hinsichtlich Spezifität als auch bezüglich Sensitivität.

Dem von Pensaert (2) durchgeführten ELISA-Blocking-Test haftet der Nachteil an, dass grosse Mengen an spezifischem Antiserum respektive Konjugat für die Durchführung benötigt werden. Verglichen mit der IIF erwies sich der ELISA-Blocking-Test ungefähr gleich sensitiv (Seren mit Antikörpertitern gerade über der Nachweisgrenze in der IIF ergaben auch bei Pensaert nur in der niedrigstmöglichen Verdünnung ein positives Ergebnis). Vorteil des ELISA-Blocking-Tests wäre allenfalls die Möglichkeit, kontaminierte Seren in einer relativ niedrigen Verdünnung einsetzen zu können. Wenn jedoch darauf geachtet wird, dass die zu untersuchenden Seren in einem einwandfreien Zustand sind (Blutproben gleich nach der Entnahme kühl lagern, Seren nach der Zentrifugation sofort bei -20°C tiefgefrieren), tritt dieses Problem in den Hintergrund und die IIF lässt sich ohne Probleme bezüglich unspezifischer Reaktionen durchführen. Ein gemeinsamer Nachteil aller bisher beschriebenen Antikörpernachweismethoden ist die Notwendigkeit, Ferkel zur Virusantigengewinnung einsetzen zu müssen. Solange jedoch das EVDV in vitro nicht zur Vermehrung gebracht werden kann, ist man bei allen Untersuchungen zwingend auf diese Art der Virusvermehrung angewiesen. Abschliessend lässt sich feststellen, dass es mit der beschriebenen Methode in Zukunft auch in der Schweiz (Institut für Virologie der Universität Zürich)

möglich ist, die Ursache bei einem Teil der seuchenhaften Durchfälle mit bisher unbekannter Genese abzuklären.

4.3. Die EVD in der Schweiz

Es konnte erstmals zweifelsfrei die Existenz des EVDV in Schweinebeständen in der Schweiz nachgewiesen werden. Damit bestätigte sich der Verdacht, dass das EVDV auch in unserem Land eine Rolle beim Durchfallgeschehen spielt, vor allem in Mastbetrieben, und dass es offensichtlich auch weiter verbreitet ist als das TGEV, denn die Darmform der TGE konnte bisher nur in 2 Betrieben festgestellt werden (1, 20). Obwohl die Anzahl der untersuchten Betriebe viel zu klein ist, um allgemeingültige Aussagen machen zu können, muss aufgrund der vorliegenden Ergebnisse angenommen werden, dass das EVDV für bis zu 50% der Fälle von akuten Durchfällen verantwortlich ist. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das EVDV nicht in jedem Fall, wo Antikörper nachgewiesen wurden, auch aetiologisch als Agens für den aktuellen Krankheitsausbruch verantwortlich sein muss, denn die Tiere könnten auch früher mit dem EVDV in Kontakt gekommen sein. Interessant ist allerdings, dass bei 24 der 25 untersuchten Betriebe Antikörper entweder nur gegen das TGEV (4 Betriebe) oder nur gegen das EVDV (6 Betriebe), oder aber gegen keines der Viren nachgewiesen wurden. Nur bei einem Betrieb konnte eine Doppelinfektion festgestellt werden. Das Vorkommen von Doppelinfektionen ist zu erwarten, denn eine überstandene TGE schützt nicht vor EVD, da keine serologische Verwandtschaft zwischen dem EVDV und dem TGEV besteht. Doppelinfektionen wurden auch in der BRD beschrieben (31).

Was die Prävalenz des EVDV in der gesamten Schweinepopulation betrifft, erstaunt die etwas niedrige Durchseuchungsrate von nur 1.6%. In anderen Ländern weist ein viel höherer Prozentsatz der Schlachtschweine Antikörper gegen das EVDV auf; so sind zum Beispiel in Belgien je nach Untersuchung zwischen 50 und 80% der

Schweinemastbetriebe mit EVD verseucht (Pensaert, pers. Mitteilung). Die von uns getesteten Schlachthofseren waren vorgängig auf Antikörper gegen das TGEV untersucht worden. Es ist möglich, dass durch das Gefrieren und Auftauen der Seren eventuell vorhandene niedrige EVDV-Antikörpertiter unter die Nachweisgrenze, das heisst unter die niedrigstmögliche Arbeitsverdünnung sanken und die Seren somit fälschlicherweise als negativ beurteilt wurden.

Die vorliegenden Ergebnisse sind eine Bestätigung des Einzelbefundes von Rutishauser (36) und zeigen, dass das EVDV schon längere Zeit in der Schweiz vorkommt. Die EVD-Ausbrüche in den Beständen waren gleichmässig über den Zeitraum von nahezu 2 Jahren verteilt, und es konnte keine jahreszeitliche Häufung der Ausbrüche festgestellt werden. Obwohl die Zahl der untersuchten und insbesondere der EVD-positiven Betriebe klein ist, deuten die vorliegenden Befunde darauf hin, dass das EVDV in verschiedenen Regionen der Schweiz verbreitet ist, und dass sowohl Zucht-, als auch Mastbetriebe davon betroffen sind.

Für die relativ grossen Schwankungen der Durchseuchungsraten und der mittleren Titerwerte in den untersuchten Betrieben gibt es 2 Gründe: Erstens war das zeitliche Intervall zwischen Krankheitsausbruch und Blutentnahme verschieden lang (10 Tage bis mehrere Monate), und zweitens war die Serumqualität unterschiedlich. Andererseits decken sich die festgestellten Unterschiede mit den verschiedenen Krankheitsverläufen in den Betrieben. Auf jeden Fall ist aufgrund der Häufigkeitsverteilung der eruierten Titer klar erkennbar, dass die Mehrzahl der Tiere aus den EVD-positiven Betrieben verhältnismässig hohe Antikörpertiter aufwies, was darauf hinweist, dass das EVDV wirklich für das aktuelle Durchfallproblem verantwortlich war.

4.4. Zellkulturversuche

Die Resultate der auf konventionelle Art durchgeführten Zellkulturversuche bestätigen die Ergebnisse früherer Arbeiten (17, 24, 43). Obwohl die verschiedensten Zellkulturen eingesetzt worden waren, erwiesen sich alle als refraktär gegenüber einer EVDV-Infektion. Auch mit Vorbehandlung des Inokulums und/oder Zusätzen im Medium war nie eine Virusvermehrung feststellbar, obschon gerade die Zuhilfenahme von Trypsin aufgrund von Ergebnissen mit anderen Coronaviren (39, 46) vielversprechend schien. Die Frage stellt sich daher, ob das Virus in einer noch nicht geprüften Zellart unter Standardbedingungen replizierbar wäre, oder ob es spezielle Bedingungen bräuchte (Zusätze, Vorbehandlungen, usw.). Die Gründe, warum es zu keiner Replikation in vitro kommt, sind unbekannt. Beispielsweise ist es völlig unklar, welche Stufe blockiert ist: Adsorption, Penetration, Uncoating, Biosynthese, Maturation? Weil nach der Inokulation von Zellkulturen kein Virusprotein mittels Immunfluoreszenz nachweisbar war, liegt es nahe anzunehmen, dass es überhaupt nicht zur Proteinsynthese kommt.

Die Möglichkeit der Vermehrung von EVDV in Zellkulturen ist aus verschiedenen Gründen bedeutsam: Erstens liessen sich einfachere, spezifischere und billigere Nachweismethoden für die Serologie (Neutralisationstest, Hämagglutinationstest, ELISA) entwickeln und zweitens könnte das EVDV in reinerer Form sowie unter Umgehung des Tierversuches gewonnen werden. Dies wiederum würde gezielte Untersuchungen am EVDV selbst erst ermöglichen (Analyse des Virusgenoms, Strukturproteinanalyse, Antigenverwandtschaft usw.). Damit ist gleichzeitig das Schwergewicht zukünftiger Untersuchungen aufgezeigt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war die Einführung einer serologischen Nachweismethode für Antikörper gegen das Virus der Epizootischen Virusdiarrhoe (EVDV) beim Schwein, die Abklärung der Verbreitung des EVDV in der schweizerischen Schweinepopulation und seiner Bedeutung als Ursache akuter seuchenhafter Durchfälle. Ausserdem sollte versucht werden, das Virus in irgendeinem Zellkultursystem zur Vermehrung zu bringen.

Der Nachweis von Antikörpern gegen EVDV erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz, die an Dünndarmgefrierschnitten von EVDV-infizierten SPF-Ferkeln durchgeführt wurde. Die indirekte Immunfluoreszenz erwies sich in unseren Versuchen als geeigneter Test, sowohl was die Spezifität als auch was die Sensitivität angeht. Ausserdem wurde zur Verwendung als Referenzserum ein Schweine-Hyperimmunserum gegen EVDV produziert.

Von 1859 Seren aus Schlachthöfen wiesen 29 (1.6%) Antikörper gegen das EVDV auf. In 7 von 14 untersuchten Einzelbetrieben mit Durchfallproblemen fanden sich Tiere mit Antikörpern gegen EVDV, wobei der Anteil positiver Seren je Betrieb zwischen 17 und 100% schwankte. Die Titer lagen zwischen 1 : 100 (Nachweisgrenze) und 1 : 3200. Mit diesen Untersuchungen wurde zum ersten Mal die Existenz des EVDV in der Schweiz nachgewiesen, und es zeigte sich, dass das EVDV eine Rolle als viraler Durchfallerreger bei Schweinen in der Schweiz spielt.

In keinem der untersuchten Zellkultursysteme und unter keiner der angewandten Kulturbedingungen konnte eine Vermehrung des EVDV in vitro nachgewiesen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bereiter, M.: Untersuchung über das Vorkommen von Transmissibler Gastroenteritis (TGE) in der Schweiz. Inaugural-Dissertation der Vet. Med. Fakultät der Universität Zürich (1987)
2. Callebaut, P. et al.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. Vet. Microbiol. 7, 295-306 (1982)
3. Caul, E.O. and Egglestone, S.I.: Coronaviruses in humans. In: Virus infections of the gastrointestinal tract (Tyrell, D.A.J. and Kapikian, A.Z., eds). Marcel Dekker Inc., New York, Basel (1982), pp. 179-193
4. Chasey, D. and Cartwright, S.F.: Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. Res. Vet. Sci. 25, 255-256 (1978)
5. Coussement, N. et al.: Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. Vet. Pathol. 19, 46-56 (1982)
6. Dea, S. et al.: An outbreak of diarrhoea in piglets caused by a coronavirus antigenetically distinct from transmissible gastroenteritis virus. Can. Vet. J. 26, 108-111 (1985)
7. Debouck, P. and Pensaert, M.B.: Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronaviruses, CV777. Am. J. Vet. Res. 41, 219-223 (1980)
8. Debouck, P. et al.: The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV777. Vet. Microbiol., 6, 157-165 (1981)

9. Ducatelle, R. et al.: In vivo morphogenesis of a new porcine enteric coronavirus, CV777. Arch. Virol. 68, 35-44 (1981)
10. Ducatelle, R. et al.: Three-dimensional sequential study of the intestinal surface in experimental porcine CV777 coronavirus enteritis. Zbl. Vet. Med. B, 28, 483-493 (1981)
11. Ducatelle, R. et al.: Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. Vet. Pathol. 19, 57-66 (1982)
12. FÜRER, W.: Virusnachweis im Kot mittels Immunelektronenmikroskopie und Antikörpernachweis im Serum mittels ELISA bei der Transmissiblen Gastroenteritis der Schweine. Inaugural-Dissertation der Vet. Med. Fakultät der Universität Zürich (1984)
13. Garwes, D.J.: Coronavirus in animals. In: Virus infections of the gastrointestinal tract (Tyrell, D.A.J. and Kapikian, A.Z., eds). Marcel Dekker Inc., New York, Basel (1982), pp 315-359
14. Gerna, G. et al.: Human coronavirus OC43 serum inhibitor and neutralizing antibody by a new plaque-reduction assay. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 163, 360-366 (1980)
15. Gerna, G. et al.: Antigenetic and biological relationship between human coronavirus OC43 and neonatal calf diarrhoea coronavirus. J. gen. Virol. 54, 91-102 (1981)

16. Hamilton, R. et al.: Functional and structural response of the intestine to enteric infections. In: Infectious diarrhoea in the young (Tzipori S., ed.), Excerpta Medica, Amsterdam-New York-Oxford (1985), pp. 165-171
17. Hess, R.G. et al.: Neue Aspekte der Virusätiologie bei Durchfallerkrankungen des Schweines: Vorkommen von Infektionen mit dem Epizootischen Virusdiarrhoe-(EVD)-Virus . Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 93, 445-449 (1980)
18. Horvath, I. and Moscari, E.: Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pigs affected with a transmissible gastroenteritis (TGE)-like disease. Arch. Virol. 68, 103-113 (1981)
19. Koch, W.: Kolostrumfreie Aufzucht von Hysterektomieferkeln. Schweiz. Arch. Tierheilk. 122, 127-136 (1980)
20. Koch, W. et al.: Erster Nachweis von transmissibler Gastroenteritis der Schweine (TGE) in der Schweiz. Schweiz. Arch. Tierheilk. 127, 589 - 595 (1985)
21. Lee, T.W. and Kurtz, J.B.: Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. J. gen. Virol. 57, 421-424 (1981)
22. Leopoldt, D. et al.: Neue virusbedingte Durchfallerkrankungen des Schweines (TGE-ähnliche Erkrankungen). Mh. Vet. Med. 36, 411-415 (1980)
23. Pensaert, M.B.: Porcine epidemic diarrhoea. In: Diseases of swine, 5th edition (Leman, A.D. et al., eds). Iowa State University Press, Ames, IA (1981), pp. 344-346

24. Pensaert, M.B. and Debouck, P.: A new coronavirus-like particle associated with diarrhoea in swine. Arch. Virol. 58, 243-247 (1978)
25. Pensaert, M.B. et al.: An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenetic relationship between the coronavirus-like agent, CV777, and several coronaviruses. Arch. Virol. 68, 45-52 (1981)
26. Pensaert, M.B.: Virale Enteritiden beim Schwein. Pro Veterinario 3/85, 9-12 (1985)
27. Pinto, M. et al.: Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture. Biol. Cell 47, 323-330 (1983)
28. Pospischil, A. et al.: Light microscopy and ultrahistology of intestinal changes in pigs infected with epizootic diarrhoea virus (EVD): Comparison with transmissible gastroenteritis (TGE) virus and porcine rotavirus infections. Zbl. Vet. Med. B., 28, 564-577 (1981)
29. Prager, D. und Witte, K.H.: Die serologische Diagnose der Epizootischen Virusdiarrhoe (EVD) des Schweines mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik (IIFT). I. Einfluss verschiedener Parameter auf den Antikörper-Titer. Tierärztl. Umschau 36, 404-414 (1981)
30. Prager, D. und Witte, K.H.: Die serologische Diagnose der Epizootischen Virusdiarrhoe (EVD) des Schweines mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik (IIFT). II. Antikörper-Antwort nach experimenteller Infektion. Tierärztl. Umschau 36, 477-480 (1981)

31. Prager, D. und Witte, K.H.: Die Häufigkeit von Transmissible Gastroenteritis (TGE)- und Epizootische Virusdiarrhoe (EVD)-Virusinfektionen als Ursache seuchenhafter Durchfälle in westfälischen Schweinezucht- und -mastbeständen. Tierärztl. Umschau 38, 155-158 (1983)
32. Quaroni, A. et al.: Epithelioid cell cultures from rat small intestine. J. Cell. Biol. 80, 248-265 (1979)
33. Quaroni, A. and May, R.J.: Establishment and characterization of intestinal epithelial cell cultures. In: Methods in cell biology, Volume 21B (Harris, C.C. et al., eds), Academic press, New York - London - Toronto - Sydney - San Francisco (1980), pp. 403-427
34. Robb, J.A. and Bond, C.W.: Coronaviridae. In: Comprehensive Virology, Volume 14 (Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R.R., eds), Plenum press, New York and London (1979), pp.193-247
35. Rutishauser, U.P. und Wyler R.: Kurze Literaturübersicht über die im Digestionstrakt der Schweine nachgewiesenen Viren. Schweiz. Arch. Tierheilk., 126, 447-452 (1984)
36. Rutishauser, U.P. et al.: Häufigkeit des Virusnachweises in Kotproben von Schweinen mit Durchfall einschliesslich Steatorrhoe. Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 453-466 (1984)
37. Sturman, L.S. et al.: Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: Activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. J. Virol. 56, 904-911 (1985)

38. Sturman, L.S. and Holmes, K.: The novel glycoproteins of coronaviruses. *TIBS* 2, 17-20 (1985)
39. Toth, T.E.: Trypsin-enhanced replication of neonatal calf diarrhoea coronavirus in bovine embryonic lung cells. *Am. J. Vet. Res.* 43, 967-972 (1982)
40. Turgeon, D.C.: Coronavirus-like particles associated with diarrhoea in baby pigs in Quebec. *Can. Vet. J.* 21, 100-101 (1981)
41. Tyrell, D.A.J. et al.: Coronaviridae: Second report. *Intervirology* 10, 321-328 (1978)
42. Watt, R.G. et al.: Human rotavirus type 2: cultivation in vitro. *Science* 207, 189-191 (1980)
43. Witte, K.H. et al.: Die Epizootische Virusdiarrhoe (EVD). *Tierärztl. Umschau* 36, 235-250 (1981)
44. Wood, E.N.: An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet. Rec.* 100, 243-244 (1977)
45. Wood, E.N.: Transmissible gastroenteritis and epidemic diarrhoea of pigs. *Brit. Vet. J.* 135, 305-314 (1978)
46. Woods, R.D.: Studies of enteric coronaviruses in a feline cell line. *Vet. Microbiol. J.* 7, 427-435 (1982)

7. VERDANKUNGEN

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken. Mein besonderer Dank gilt

- Herrn Prof. Dr. R. Wyler für die Überlassung des Themas und das Referat sowie für die jederzeit grosszügige fachliche und moralische Unterstützung
- Herrn Prof. Dr. H. Keller für die Übernahme des Korreferates
- Herrn Prof. Dr. M.B. Pensaert, Gent, Belgien, für die Überlassung des EVD-Serums und -Konjugates, sowie für die methodischen Ratschläge
- Herrn Prof. Dr. K.H. Witte, Arnsberg, BRD, für die Überlassung der EVD-Viruspräparation, des EVD-Serums und -Konjugates, sowie für die fachliche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Methodik
- Herrn M. Bereiter, SGD-Genossenschaft Zürich, für die Überlassung der Schweineseren

8. LEBENS LAUF

Martin Andreas Hofmann, geboren am 4. April 1959 in Sissach BL

1966 - 1975	Besuch der Primar- und Sekundarschule in Gelterkinden
1975 - 1978	Gymnasium Liestal mit Maturitätsabschluss Typus B
1978 - 1979	1. Jahr Studium der Veterinärmedizin und 1. Propädeutikum an der Universität Basel
1979 - 1983	Studium der Veterinärmedizin und Staatsexamen an der Universität Zürich
1983 - 1985	Assistent bei den Tierärzten Dr. F. Blaser, Schönenberg ZH und Dr. R. Wettstein, Möhlin AG
seit Oktober 1985	Assistent am Institut für Virologie der Universität Zürich (Prof. Dr. R. Wyler)

